

プリオン蛋白トランスジェニックマウスを使った正常型プリオン蛋白の局在に関する研究

著者	樋口 じゅん
号	1511
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/21742

氏 名（本籍）	樋 口 じ ゅ ん <small>ひぐち</small>
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 5 1 1 号
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻
学 位 論 文 題 目	Localization in Distinct Cell Populations of Cellular Prion Protein Over-Expressed with An Endogenous Prion Protein Promoter in Transgenic Mice. （プリオン蛋白トランスジェニックマウスを使っ た正常型プリオン蛋白の局在に関する研究）
論文審査委員	（主 査） 教授 糸 山 泰 人 教授 笠 井 憲 雪 教授 野 田 哲 生

論 文 内 容 要 旨

人と動物に認められる海綿状脳症の中で感染性がある疾患群として、ヒツジのスクレーピー、ウシの Bovine spongiform encephalopathy (BSE)、ヒトの Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (GSS), Fatal familial insomnia (FFI) がある。これらの疾患は罹患した個体の脳から抽出される核酸を持たない蛋白質性感染因子 (proteinaceous infectious particle) プリオンにより接種した人間や動物に感染させることができるという大きな特徴をもち、それ故この疾患群はプリオン病と呼ばれている。プリオンの主な構成成分である正常型プリオン蛋白 (cellular form of prion protein, PrP^c) は野生型動物の多くの組織に分布している。プリオン病に罹患した個体では、異常型プリオン蛋白 (proteinase-resistant form prion protein, PrP^{sc}) の蓄積が認められ、これらは感染性が認められる。しかしながら、異常型プリオン蛋白の蓄積は中枢神経系とリンパ節の濾胞樹状細胞のみにしか認められていない。このことは PrP^{sc} に変異しない、あるいは変異しにくい PrP^c が発現している細胞群が存在することを示唆する。しかしながら PrP^c の局在については今までの方法では感度が低く、系統的な検索ができなかった。本研究では PrP^c を発現している細胞群をより正確に同定するためにマウスの PrP の endogenous promoter を用いて、プリオン蛋白を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し遺伝子組換えにより導入されたプリオン蛋白 (以下 rPrP) を発現する細胞群を、神経系および非神経系の組織において系統的に解析することを計画した。本研究でのトランスジェニックマウスのコンストラクトでは、プリオン蛋白の Open reading frame における C 末端の signal peptide を含む領域と、N 末端の glycosyl phosphatidyl inositol phospholipid anchorings site を含む領域をマウス型のアミノ酸配列にし、その間の codon 39 から 188 までの配列をヒト型にした。これによって、ヒト型の PrP の codon 107 から codon 111 のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体 3F4 を使うことができ、また、ヒト型の感染物質への感受性をあげることができ、ヒト由来のマテリアルの安全性検査にも使うことができる。トランスジェニックマウスは 8 系統のマウスを継代でき、20 倍から 1 倍程度の様々なトランスジーン発現量を持つマウスを作成することができた。トランスジェニックマウスの rPrP mRNA の分布は、ほぼ endogenous pattern に等しいものであった。in situ hybridization では neuron を含めた神経系に発現を認め、グリア細胞には発現していなかった。Western blot による検索では、脳、心臓、腎臓、精巣、骨格筋にその発現を確認できたが分子量はさまざまであった。これらは deglycosylation treatment により deglycosylated PrP の分子量に収束し、各組織で glycosylation form に違いがある rPrP が発現していることが解明さ

れた。免疫組織学的検索により、rPrP は次の 6 系統の細胞群に認められた ; Group 1, 中枢神経系 ; Group 2, 末梢神経系 (dorsal root ganglion 細胞, 消化管 Auerbach's 神経叢の節細胞) ; Group 3, 骨格筋および心筋の筋細胞 ; Group 4, 神経堤由来の神経内分泌細胞 (甲状腺 C 細胞, 副腎髄質細胞) および非神経堤由来の細胞 (下垂体の内分泌細胞, 肺気管支の Kulchitsky 細胞, 膵臓の islet 細胞) ; Group 5, 輸精管上皮の生殖細胞 ; Group 6, リンパ組織の濾胞樹状細胞。野生型ハムスターの凍結切片における免疫蛍光法による検索により, これらの一部の細胞群では正常型プリオン蛋白の発現を確認することができた。このことは本研究のトランスジェニックマウスにおける rPrP の発現が野生型動物の endogenous PrP と等しいか近いことを示唆している。PrP^cが特定の細胞群に局在していることは PrP の生理学的あるいは病態学的な機能を解明する上で鍵となるものである。

審 査 結 果 の 要 旨

人と動物に認められる海綿状脳症の中で感染性がある疾患群として、ヒツジのスクレーピー、ウシの BSE、ヒトの Kuru, CJD, GSS がある。これらの疾患は核酸を持たない蛋白質性感染因子 (proteinaceous infectious particle) プリオンにより接種した人間や動物に感染させることができプリオン病と呼ばれている。プリオンの主な構成成分である正常型プリオン蛋白 (cellular form of prion protein PrP^c) は野生型動物の多くの組織に分布している。プリオン病に罹患した固体では、異常型プリオン蛋白 (proteinase resistant form prion protein, PrP^{sc}) の蓄積が認められ、その蓄積は中枢神経系とリンパ節の濾胞樹状細胞のみにしか認められていない。しかしながら PrP^c の局在については今までの方法では感度が低く、系統的な検索ができなかった。

本研究では PrP^c を発現している細胞群をより正確に同定するためにマウスの PrP^c の endogenous promoter を用いて、プリオン蛋白を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、遺伝子組換えにより導入されたプリオン蛋白 (以下 rPrP) を発現する細胞群を、神経系および非神経系の組織において系統的に解析することを目的としたものである。本研究でのトランスジェニックマウスのコンストラクトでは、プリオン蛋白の Open reading frame における C 末端の signal peptide を含む領域と、N 末端の glycosyl phosphatidyl inositol phospholipid anchoring site を含む領域をマウス型のアミノ酸配列にし、その間の codon39 から 188 までの配列をヒト型にした。これによって、ヒト型の PrP の codon107 から codon111 のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体 3F4 を Western blot および免疫組織学的検索に使うことができた。トランスジェニックマウスの rPrP mRNA の分布は、in situ hybridization では neuron を含めた神経系に発現を認め、グリア細胞には発現していなかった。Western blot による検索では、脳、心臓、腎臓、精巣、骨格筋にその発現を確認できたが分子量はさまざまであった。免疫組織学的検索により rPrP は中枢神経系、末梢神経系、骨格筋および心筋の筋細胞、神経堤由来の神経内分泌細胞、輸精管上皮の生殖細胞、リンパ組織の濾胞樹状細胞に認められた。

PrP^c が特定の細胞群に局在していることは PrP の生理学的あるいは病態学的な機能を解明する上で重要であり、本研究は十分に学位に値するものである。